

## Hasil Penelitian

### EFEK INHALASI MINYAK KAYU PUTIH (*Melaleuca leucadendron*) TERHADAP JUMLAH SEL SPERMATID MENCIT JANTAN (*Mus musculus*) YANG DIINDUKSI STRES AKUT

Aldy M. Wajabula<sup>1</sup>, Merlin M. Maelissa<sup>2</sup>, Halidah Rahawarin<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Pattimura

<sup>2</sup>Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Pattimura

<sup>3</sup>Dosen Fakultas Kedokteran Universitas Pattimura

Corresponding author e-mail : [hldhrhwrn@gmail.com](mailto:hldhrhwrn@gmail.com)

#### Abstrak

Stres mengacu pada peristiwa yang dapat mempengaruhi kondisi fisik dan psikis seseorang, termasuk dalam proses spermatogenesis. Minyak kayu putih memiliki efek antidepresan yang berperan mencegah agar stres tersebut tidak terus berlangsung. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui bagaimana pemberian inhalasi minyak kayu putih terhadap jumlah sel spermatid pada mencit jantan (*Mus musculus*) yang diberikan paparan stres akut. Penelitian ini merupakan penelitian *true experimental* dengan pendekatan *post test only control group design*. Sebanyak 28 ekor mencit jantan dewasa dipilih secara *simple random sampling* dikelompokkan dalam empat kelompok, yaitu kelompok kontrol normal (tidak diberikan perlakuan); kelompok kontrol negatif (diberikan paparan stres akut); kelompok kontrol positif (diberikan 0,2 mL alprazolam dan paparan stres akut); kelompok perlakuan (diberikan 0,5 mL minyak kayu putih dan paparan stres akut). Perlakuan stres dilakukan selama enam menit per hari dalam 14 hari. Hasil penelitian dengan menggunakan uji statistik *one way ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan antara setiap kelompok percobaan ( $p < 0,001$ ). Hasil uji lanjut Tukey menunjukkan bahwa terdapat perbedaan signifikan antara kelompok minyak kayu putih yang diberikan paparan stres dengan intervensi dan kelompok kontrol negatif yang diberikan paparan stres tanpa intervensi ( $p < 0,001$ ). Hal ini membuktikan bahwa minyak kayu putih memiliki efek pencegahan terhadap stres dan mencegah penurunan jumlah sel spermatid.

**Kata kunci:** Mencit, minyak kayu putih, sel spermatid, stres akut.

#### Abstract

*Stress refers to events that can affect a person's physical and psychological condition, including in the process of spermatogenesis. Eucalyptus oil has an antidepressant effect which acts to prevent the stress from continuing. This study aims to determine how the administration of eucalyptus oil inhalation on the number of spermatid cells in male mice (*Mus musculus*) exposed to acute stress. This research is a true experimental study with a posttest only control group design approach. A total of 28 adult male mice selected by simple random sampling were grouped into four groups, namely the normal control group (no treatment); negative control group (given exposure to acute stress); positive control group (administered 0.2 mL alprazolam and exposure to acute stress); treatment group (given 0.5 mL of eucalyptus oil and exposure to acute stress). Stress treatment was carried out for six minutes per day in 14 days. The results of the study using the oneway ANOVA statistical test showed that there was a difference between each experimental group ( $p < 0.001$ ). Tukey's further test results showed that there was a significant difference between the eucalyptus oil group given stress exposure with intervention and the negative control group given stress exposure without intervention ( $p < 0.001$ ). This proves that eucalyptus oil has a preventive effect on stress and prevents a decrease in the number of spermatid cells.*

*Keywords: Acute Stress, Eucalyptus oil, Mice, Spermatid Cells.*

## Pendahuluan

Stres adalah gangguan homeostasis yang menyebabkan perubahan pada keseimbangan fisiologis yang dihasilkan dari adanya rangsangan terhadap fisik maupun psikologi.<sup>1</sup> Stres juga merupakan salah satu faktor penyebab penurunan kuantitas dan kualitas spermatozoa. Penyebab utama kesuburan pria adalah kuantitas dan kualitas spermatozoa, yang meliputi jumlah, motilitas, dan morfologi spermatozoa.<sup>6</sup> Penelitian Eris dan Irma<sup>7</sup> membuktikan bahwa terdapat hubungan antara stres psikologis dengan kuantitas dan kualitas spermatozoa. Stres psikologis pada tikus menimbulkan hambatan proses pada tingkat hipotalamus dan menyebabkan gangguan hormonal, sehingga mengakibatkan kegagalan sel Leydig mensekresi hormon testosteron.<sup>7</sup>

Ketidaksuburan atau infertilitas merupakan masalah global yang mempengaruhi lebih dari 80 juta orang di dunia, terjadi sekitar 15% pada pasangan suami-istri. Insiden infertilitas meningkat sejak 40 tahun terakhir.<sup>10</sup> Infertilitas pada pria berkaitan erat dengan proses spermatogenesis. Proses ini dipengaruhi oleh dua faktor, yaitu faktor internal dan eksternal.<sup>12</sup> Faktor internal meliputi faktor hormonal, psikologi, dan genetik. Adapun faktor eksternal meliputi bahan kimia (obat-

obatan dan bahan kimia lainnya), fisik (suhu, radiasi, dan gelombang ultrasonik), vitamin dan gizi, serta trauma dan peradangan.<sup>5</sup>

Spermatogenesis adalah suatu proses perkembangan sel-sel spermatogenik yang membelah beberapa kali dan akhirnya berdiferensiasi menghasilkan spermatozoa.<sup>13</sup> Proses spermatogenesis dikendalikan oleh suatu poros hipotalamus, hipofisis, dan testis.<sup>14</sup> Terganggunya proses spermatogenesis dapat berakibat pada kuantitas dan kualitas sperma yang akan dihasilkan. Stres akan mengganggu pada tingkat hormonal, pada proses sekresi GnRH, dimana akan terjadi peningkatan berlebihan dari hormon GnRH, sehingga akan terjadi umpan balik terhadap sekresi *Follicle Stimulating Hormone* (FSH) dan *Luteinizing Hormone* (LH). Penurunan hormon FSH dan LH akan mengakibatkan penurunan dari sekresi hormon testosteron, yang berujung pada terganggunya proses spermatogenesis.<sup>4</sup>

Stres dapat dicegah atau dikurangi gejalanya menggunakan terapi farmakologi dan psikoterapi, namun terdapat juga terapi alternatif yang lebih murah dan aman. Terapi alternatif yang dapat dilakukan adalah pijat refleksi,

yoga, shiatsu, meditasi, dan aroma

terapi. Salah satu aromaterapi yang telah digunakan, yaitu minyak kayu putih.<sup>15</sup>

Minyak kayu putih merupakan salah satu minyak atsiri yang diperoleh dari hasil penyulingan daun kayu putih (*Melaleuca leucadendron*) yang ada di Pulau Buru, Maluku.<sup>15</sup> Minyak kayu putih ini memiliki manfaat yang cukup besar, salah satunya digunakan sebagai obat-obatan. Khasiat utama dari minyak kayu putih adalah untuk melancarkan peredaran darah dengan melebarkan pori-pori kulit sehingga badan menjadi lebih hangat dan tidak akan mengganggu pernapasan kulit karena adanya sifat dari minyak kayu putih yang mudah menguap. Komponen terbesarnya ialah 1,8-*cineole* yang merupakan senyawa monoterpena berkisar antara 55–65%.<sup>17</sup> Senyawa 1,8-*cineole* berperan sebagai antimikroba, analgesik, antiinflamasi, antibakteri, antifungal, antiprotozoal, antioksidan, antispasmodik, antivirus, meningkatkan aliran darah otak, efek analgesik, efek sedatif, dan mukolitik.<sup>18</sup>

Berdasarkan hal tersebut, senyawa pada minyak kayu putih, yaitu 1,8-*cineole* dapat memberikan efek sedatif dan mengurangi stres yang akan berdampak pada jumlah sel spermatogenik, spermatisit, dan spermatid. Permasalahan utama dalam penelitian ini adalah bagaimana efek inhalasi minyak kayu putih terhadap jumlah sel spermatid mencit yang

diinduksi stres akut? Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek inhalasi minyak kayu putih terhadap jumlah sel spermatid mencit jantan yang diinduksi stres akut.

### Metode

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan desain penelitian *posttest only control group design*. Penelitian ini dilakukan pada Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Pattimura Ambon dan berlangsung pada bulan Agustus–September 2021.

Sampel dalam penelitian ini menggunakan 28 ekor hewan uji, yaitu mencit jantan (*Mus musculus*) dengan berat badan berkisar 20–30 gram yang diperoleh dari Koleksi Peternakan Mencit Makassar. Pengambilan sampel dilakukan secara acak (*simple random sampling*) untuk menghindari bias. Sampel kemudian dikelompokkan menjadi empat kelompok, yaitu KN (kelompok yang tidak diberikan perlakuan stres), K- (kelompok yang diberikan perlakuan stres), K+ (kelompok yang diberi obat alprazolam), P1 (kelompok yang diberi inhalasi minyak kayu putih).

Prosedur penelitian: aklimatisasi dilakukan di laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Pattimura Ambon selama 1 minggu; apabila terdapat hewan coba yang sakit atau mati, atau berat badan turun >10%, maka akan dikeluarkan

dari penelitian. Kondisi ruangan bertemperatur 20–25 °C, dengan kelembapan 50–60%.<sup>53</sup> Sebanyak 28 ekor mencit jantan diletakkan di dalam kandang yang dibagi menjadi satu ekor per kandang. Makanan yang diberikan pada mencit adalah pakan AD2 dan minuman yang diberikan adalah air keran yang diletakkan dalam botol. Makanan dan minuman diberikan *ad libitum* secukupnya dalam wadah terpisah dan diganti setiap hari.<sup>51</sup> Dosis alprazolam yang akan diberikan ditentukan berdasarkan tabel konversi perhitungan dosis oleh Lurence dan Bacharach,<sup>54</sup> yaitu konversi berat badan manusia  $\pm 70$  kg ke mencit dengan berat badan  $\pm 20$  g menjadi 0,0026. Dosis alprazolam yang dipakai 0,0039 mg/hari. Mencit sebanyak 28 ekor dibagi menjadi empat kelompok perlakuan, yaitu KN {(kontrol normal) kelompok mencit yang tidak diberi perlakuan stres}, K- {(kontrol negatif) kelompok mencit yang diberi perlakuan stres}, K+ {(kontrol positif) kelompok mencit diberi perlakuan stres dan obat alprazolam}, P (kelompok mencit yang diberi perlakuan stres dan inhalasi minyak kayu putih). Pada kelompok mencit K-, K+, P akan digantung ekornya. Uji penggantungan ekor atau TST selama enam menit setiap hari dan perlakuan ini berlangsung selama 14 hari.<sup>8,46</sup> Kemudian pada kelompok K+

diberi obat alprazolam, P diberi inhalasi minyak kayu putih dengan konsentrasi yang sudah ditentukan. Perlakuan diberikan selama 14 hari. Pada kelompok P, inhalasi minyak kayu putih dengan cara mencit dimasukkan ke dalam suatu inhalasi *chamber* selama satu jam. Kemudian hari ke 14 dilakukan pembedahan dan diangkat organ testis, lalu dibuat preparat histologi semeniferus dari organ testis.

## Hasil

**Tabel** Rata-rata jumlah sel spermatid mencit pasca-induksi stres akut

Kelompok Perlakuan	n	Rata-rata Sel Spermatid	Jumlah p
Normal	6	57,60	
Kontrol (-)	7	31,68	
Kontrol (+)	7	54,07	0,001
Perlakuan	8	52,48	

**Tabel** Hasil analisis *post hoc* dengan menggunakan uji Tukey

Pasangan Kelompok	Mean Difference	p
Kontrol +	3,5352	0,116
Normal	Kontrol - 25,9280	0,001*
	Perlakuan 5,1222	0,009
	Normal - 3,5352	0,116
Kontrol +	Kontrol - 22,3928	0,001*
	Perlakuan 1,5870	0,675
	Normal - 25,9280	0,001*
Kontrol -	Kontrol + - 22,3928	0,001*
	Perlakuan - 20,8058	0,001*
	Normal - 5,1222	0,009
Perlakuan	Kontrol + - 1,5870	0,675
	Kontrol - 20,8058	0,001*

\*Perbedaan rata-rata yang signifikan

## Pembahasan

### **Gambaran Jumlah Sel Spermatid pada Mencit yang Diberikan Paparan Stres Akut Tanpa Diberikan Intervensi Tambahan**

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif yang hanya diberikan paparan stres akut dengan metode TST selama enam menit, memiliki rata-rata jumlah sel spermatid yang terendah (31,68) apabila dibandingkan dengan kelompok penelitian lainnya. Hasil uji statistik juga menunjukkan terdapat perbedaan nyata yang signifikan antara kelompok negatif dengan kelompok normal ( $p < 0.001$ ). Hal ini membuktikan stres dapat mengganggu proses spermatogenesis melalui peningkatan berlebihan sekresi GnRH yang kemudian menjadi umpan balik negatif sehingga menekan konsentrasi FSH, LH, dan Testosteron.

Epinefrin dan norepinefrin yang meningkat juga akan menyebabkan vasokonstriksi dari pembuluh darah, sehingga suplai darah ke testis akan menurun yang menyebabkan fungsi testis terganggu dan pada akhirnya proses spermatogenesis akan terganggu.<sup>14,32,34</sup> Hasil penelitian ini sesuai dengan penelitian yang dilakukan oleh Zhou Dang,<sup>8</sup> jumlah sel sperma menurun secara signifikan setelah diberikan stres dengan metode TST selama 14 hari. Dalam penelitian ini,

mencit diberi perlakuan TST selama 14 hari, karena disesuaikan dengan penelitian sebelumnya.

### **Gambaran jumlah sel spermatid pada mencit yang diberikan paparan stres akut dan pemberian alprazolam**

Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada kelompok kontrol positif yang diberikan paparan stres dan alprazolam, tampak rata-rata jumlah sel spermatid (54,07) memiliki rata-rata yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (31,68). Hasil uji statistik juga menunjukkan bahwa terdapat perbedaan nyata yang signifikan antara kelompok kontrol positif (paparan stres dan alprazolam) dengan kelompok kontrol negatif yang hanya diberikan paparan stres ( $p < 0.001$ ). Hal ini menunjukkan bahwa alprazolam memiliki efek antistres yang dapat mencegah penurunan jumlah sel spermatid.

Secara klinis, semua benzodiazepin menghasilkan aktivitas depresan sistem saraf pusat tergantung pada dosis yang diberikan.<sup>36,38</sup> Dosis alprazolam yang diberikan pada penelitian ini adalah 0,0039 mg/hari, diberikan secara per oral pada mencit.

### **Gambaran jumlah sel spermatid pada mencit yang diberikan paparan stres akut dan inhalasi minyak kayu putih**

Hasil pengamatan menunjukkan

bahwa pada kelompok perlakuan yang diberikan paparan stres dan inhalasi minyak kayu putih tampak rata-rata jumlah sel spermatid pada kelompok minyak kayu putih (52,48) memiliki rata-rata yang lebih tinggi dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif (31,68). Hipotesis awal pada penelitian ini adalah terdapat perbedaan jumlah sel spermatid setelah inhalasi minyak kayu putih pasca-paparan stres akut. Dengan uji *one-way* ANOVA diperoleh hasil perbedaan nyata yang signifikan dengan nilai ( $p < 0.001$ ), yang menyatakan  $H_1$  diterima. Hal ini membuktikan bahwa minyak kayu putih memiliki efek antistres yang dapat mencegah penurunan jumlah sel spermatid.

1,8-*cineole* merupakan senyawa terbanyak yang terkandung dalam minyak kayu putih. Senyawa ini memiliki efek antara lain: antimikroba, analgesik, antiinflamasi, antibakteri, antifungal, antiprotozoal, antioksidan, antispasmodik, antivirus, meningkatkan aliran darah otak, efek analgesik, efek sedatif, dan mukolitik. Efek *sedatif-hipnotik* inilah yang akan sangat berperan pada proses pasca-stres akut.

1,8-*cineole* dapat mengurangi kecemasan, memberikan efek *sedative-hypnotic*, dan mengurangi stres. Sehingga dalam kondisi stres yang harusnya terjadi, ialah gangguan pada interaksi hormon

testosteron, FSH, dan LH yang akan menyebabkan gangguan pada proses spermatogenesis dan penurunan jumlah sel spermatid. Tetapi karena senyawa 1,8-*cineole* dapat memberikan efek secara tidak langsung terhadap pengurangan kecemasan, sampai kepada stres, hal ini dapat mencegah penurunan jumlah sel spermatid.<sup>16,39,40,43,44</sup>

### Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka dapat disimpulkan bahwa: pemberian inhalasi minyak kayu putih dengan dosis 0,5 mL dapat mencegah penurunan jumlah sel spermatid pada testis mencit yang diinduksi stres akut; terdapat perbedaan jumlah sel spermatid yang signifikan antara kelompok mencit diinduksi stres dan diberikan inhalasi minyak kayu putih dengan kelompok yang tidak diberikan inhalasi minyak kayu putih.

### Daftar Pustaka

1. Lumban Gaol NT. Teori stres: stimulus, respons, dan transaksional. *Bul Psikol.* 2016;24(1):1.
2. Suryaningsih F, Karini SM, Karyanta NA. Hubungan antara self-disclosure dengan stres pada remaja siswa SMP Negeri 8 Surakarta. *J Ilm Psikol Candrajiwa.* 2016;4(4):300–10.
3. Lubis R, Irma NH, Wulandari R, Siregar K, Tanjung A, Wati TA, et al. Coping stress pada mahasiswa yang bekerja. *Diversita.* 2015;1(2):48–57.
4. Arief YS. Stres dapat mengganggu proses spermatogenesis pada mencit. *J Ners.* 2011;6(2):169–74.
5. Gde L, Surya S, Nyoman N, Susari W, Kardena IM, Nyoman D, et al. Paparan formalin menghambat proses

- spermatogenesis pada mencit. 2011;12(3):214–9.
6. Penyebab Infertilitas pada Pria dan Wanita. Rumah Sakit Univ Airlangga. 2013;1–2.
  7. Erris, Harahap I. Pengaruh kebisingan terhadap kuantitas dan kualitas spermatozoa tikus putih (*Rattus norvegicus*) jantan dewasa. 2014;123–8.
  8. Zhou D, Qiu S, Wang Z, Zhang J. Effect of tail suspension on the reproduction of adult male rats. Eur PubMed Cent. 2006;12(4):326–9.
  9. Syarif YM, Bachri MS, Nurani LH. Potensi ekstrak etanol 70% akar saluang balum (*Lavanga sarmentosa blume kurz*) terhadap kualitas dan viabilitas sperma mencit. *Pharmaciana*. 2016;6(2):131–8.
  10. Rayburn DS and Carey. *Obstetric and Gynecology*. Kalik TMA, editor. Jakarta: EGC; 2014. 313–332 p.
  11. Rahmawati I. Pengaruh nikotin terhadap jumlah sel leydig pada mencit (*Mus musculus*). 2013;10(2):82–5.
  12. Sa'adah N, Purnomo W. Karakteristik dan perilaku berisiko pasangan infertil di Klinik Fertilitas dan Bayi Tabung Tiara Cita Rumah Sakit Putri Surabaya. *J Biometrika dan Kependud*. 2017;5(1):61–9.
  13. Biologi J, Udayana U, Jimbaran KB. Gangguan spermatogenesis setelah pemberian monosodium glutamat pada mencit (*Mus musculus l.*). *J Biol*. 2011;15(2):49–52.
  14. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. *Ganong Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. In: Fungsi Sistem Reproduksi Pria. 24th ed. Jakarta: EGC; 2014. Hal 419–28.
  15. Agustina ZA, Suharmiati S. Pemanfaatan minyak kayu putih (*Melaleuca leucadendra linn*) sebagai alternatif pencegahan kasus infeksi saluran pernapasan akut di Pulau Buru. *J Kefarmasian Indones*. 2017;7(2):120–6.
  16. Sudradjat SE. Minyak kayu putih, obat alami dengan banyak khasiat: tinjauan sistematik. *J Kedokt Meditek*. 2020;26(2):51–9.
  17. Helfiansah R, Sastrohamidjojo H, Riyanto. Isolasi, identifikasi, dan pemurnian senyawa 1,8-sineol minyak kayu putih (*Malaleuca leucadendron*). *ASEAN J Syst Eng*. 2013;1(1):19–24.
  18. Batubara I, Herawati I, Annisa Rakhmatika F. Sineol dalam minyak kayu putih sebagai pelangsing dan aromaterapi. *J Jamu Indones*. 2016;1(3):12–7.
  19. Rizal M, Herdis. Peranan antioksidan dalam meningkatkan kualitas semen beku. *Wartozoa*. 2010;2(3):139–45.
  20. Fink G. Stress: concepts, definition, and history. *Curated Ref Collect Neurosci Biobehav Psychol*. 2017;1–9.
  21. Selye H. Allergy and the general adaptation syndrome. *Int Arch Allergy Immunol*. 1952;3(4):267–78.
  22. Ibrahim H, Amansyah M, Yahya GN. Faktor - faktor yang berhubungan dengan stres kerja pada pekerja factory 2 PT. *Maruki Internasional Indonesia Makassar tahun 2016*. *Al-Sihah Public Heal Sci J*. 2016;8(1):60–8.
  23. Nuzulawati MT. Hubungan antara kepribadian tipe A dengan stres kerja pada guru SMK Muhammadiyah Tegal. *J Proyeksi*. 2016;11(1):15–23.
  24. Fitrianda MI. Hubungan tingkat stres dengan self care dalam pengelolaan pembatasan cairan pada pasien hemodialisa di RSUD dr. Haryanto Lumajang. *Universitas Jember*; 2019.
  25. Larasati R. Pengaruh stres pada kesehatan jaringan periodontal. *J Skala Husada*. 2016;13:81–9.
  26. Musradinur. Stres dan cara mengatasinya dalam perspektif psikologi. *J Edukasi*. 2016;2(2):183–200.
  27. Valsamakis G, Chrousos G, Mastorakos G. Stress, female reproduction and pregnancy. *Psychoneuroendocrinology*. 2019;100:48–57.
  28. Cannon W. Stresses and strains of homeostasis. *Am J Med Sci*. 1935;189(1):1–14.
  29. Sherwood L. *Fisiologi Manusia dari Sel ke Sistem*. Dalam: Sistem reproduksi : Fisiologi reproduksi pria. 8th ed. Jakarta: EGC; 2014. Hal 773–91.
  30. Dunleavy JEM, O'Bryan MK, Stanton PG, O'Donnell L. The cytoskeleton in spermatogenesis. *Reproduction*. 2019;157(2):53–72.
  31. Neto FTL, Bach PV, Najari BB, Li PS, Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Semin Cell Dev Biol*. 2016;59:10–26.
  32. Hall JE, Guyton AC. *Guyton and Hall Buku Ajar Fisiologi Kedokteran*. Dalam:

- Endokrinologi dan Reproduksi. 12th ed. Singapore: Elsevier; 2016. Hal 973–84.
33. Wagenmaker ER, Moenter SM. Exposure to acute psychosocial stress disrupts the luteinizing hormone surge independent of estrous cycle alterations in female mice. *J Endocrinol Soc.* 2017;158(8):2593–602.
  34. Dobson H, Fergani C, Routly JE, Smith RF. Effects of stress on reproduction in ewes. *Anim Reprod Sci.* 2012;130(3–4):135–40.
  35. Yuhendri P. Pengaruh rokok terhadap jumlah sel spermatozoa mencit jantan (*Mus musculus*, strain jepang). *J Sainstek.* 2014;VI(1):30–42.
  36. Amir S, Anggi G, Ari E, Armen M, Azalia A. Farmakologi dan Terapi. Dalam: *Hipnotik-Sedatif dan Alkohol*. 6th ed. Jakarta: Badan Penerbit FKUI; 2016. Hal 141–9.
  37. Manouchehri N, Abbasi-Maleki S, Mousavi Z. A comparison of the anxiolytic and hypnotic effects of *origanum majorana* essential oil and alprazolam in male mice. *Herb Med J.* 2019;4(1):18–26.
  38. Chakradhar T, Mondal S. Review on drug interactions of alprazolam on pharmacodynamic and pharmacokinetic actions. *Eur J Biomed Pharm Sci.* 2019;6(1):657–62.
  39. Fernandes A, Agency D, Rizki M. Pengembangan hasil hutan bukan kayu Indonesia untuk mendukung sustainable development goals. Dalam: *Budidaya tanaman kayu putih (Melaleuca cajuputi subs Cajuputi)*. Bogor: IPB Press; 2019. Hal 99–118.
  40. Rimbawanto A, Kartikawati NK, Prastyono. Minyak kayu putih dari tanaman asli Indonesia untuk masyarakat Indonesia. Dalam: *Seluk beluk tanaman kayu putih*. Yogyakarta: Kaliwangi; 2017. Hal 7–19.
  41. Widiyanto A, Siarudin M. Sifat fisikokimia minyak kayu putih jenis *Asteromyrtus brasii*. *J Penelit Has Hutan.* 2014;32(4):243–52.
  42. Rimbawanto A, Kartikawati NK, Prastyono. Minyak kayu putih dari tanaman asli Indonesia untuk masyarakat Indonesia. Dalam: *Minyak kayu putih*. Yogyakarta: Kaliwangi; 2017. Hal 65–99.
  43. Rini P, Ohtani Y, Ichiura H. Antioxidant, anti-hyaluronidase and antifungal activities of *Melaleuca leucadendron* Linn. leaf oils. *J Wood Sci.* 2012;58(5):429–36.
  44. Paath JJ, Que BJ, Taihuttu YMJ, Fakultas M, Universitas K, Ji P, et al. Perbandingan efek sedatif minyak atsiri pala dan minyak kayu putih terhadap mencit Balb/C yang diinduksi stres akut. 1–21.
  45. Kirana Efruan G, Martosupono M, Rondonuwu FS. Review: Bioaktivitas senyawa 1,8-sineol pada minyak atsiri. 2016;2016:2557–533.
  46. Can A, Dao DT, Terrillion CE, Piantadosi SC, Bhat S, Gould TD. The tail suspension test. *J Vis Exp.* 2012;(59):2–7.
  47. Duman CH. Vitamins and Hormones. In: *Models of Depression*. United State of America: Elsevier Inc; 2010. p. 1–21.
  48. Ittiyavirah S, Anurenj D. Adaptogenic studies of acetone extract of *Musa paradisiaca* L. fruit peels in albino Wistar rats. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis.* 2014;4(2):88–95.
  49. Toruntju SA, La B, Leksono P, Rahmat M, Salma WO. The influence of wedge sea hare (*Dolabellaauricularia*) extract and papaya juice on hemoglobin (Hb) and feritin levels of mice strain (Balb/C) with anemia. *Medico-Legal Updat.* 2020;20(1):1347–52.
  50. Theodorus E, Muhartono, Putri GT. Pengaruh pemberian ekstrak etanol rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*) terhadap gambaran histopatologi otak mencit (*Mus musculus*) yang diinduksi monosodium glutamate. *J Ilm Mhs Kedokt Indones.* 2019;7(2):1–10.
  51. Puspawati L. Efek ekstrak biji pepaya (*Carica papaya*) terhadap kadar glukosa darah tikus putih jantan (*Rattus norvegicus*) galur wistar yang diinduksi aloksan. Universitas Muhammadiyah Surakarta; 2019.
  52. Prameswara IGN. Pemberian growth hormone meningkatkan jumlah sel spermatogenesis, sel leydig, dan sel sertoli pada mencit (*Mus musculus*) tua. Denpasar: Universitas Udayana; 2015.
  53. Ridwan E. Etika pemanfaatan hewan percobaan dalam penelitian kesehatan. *J Indon Med Assoc.* 2013;63(3):112–6.
  54. Laurence Desmond Roger, Louis BA. Evaluation of drug activities: pharmacometrics. 1st ed. London: Academic Press INC; 1964.
  55. Darmayanti A, Zainal R, Irwanto FH. Efektivitas pemberian alprazolam 0,5 mg



- oral preoperatif terhadap penurunan kadar alpha amylase saliva sebagai indikator kecemasan pada pasien yang akan dilakukan operasi tumor payudara. *Anesth Crit Care*. 2017;35(2):86–95.
56. Rudy NA. Mengenal mencit sebagai hewan laboratorium. Dalam: Teknik euthanasia, anestesi dan analgesia. Samarinda: Mulawarman University PRESS; 2018. Hal 99.
  57. Rudy NA. Mengenal mencit sebagai hewan laboratorium. Dalam: Membedah mencit pembedahan. Samarinda: Mulawarman University PRESS; 2018. Hal 108–13.
  58. Istiana H. Pengaruh pemberian ekstrak biji anggur terhadap ekspresi cAMP responsive element modulator dan profil protein testis pada tikus putih yang diberi paparan asap rokok. Universitas Brawijaya; 2017.
  59. Harlis WO, Septiana A. Gambaran histologi testis mencit (*Mus musculus*) setelah pemberian ekstrak tumbuhan brotowali (*Tinospora crispa*). *Biowallacea*. 2017;4(1):558–65.
  60. Pranadya NME, Setyawati I, Yulihastuti DA. Jumlah sel-sel spermatogenik dan histologis testis mencit (*Mus musculus* L.) pasca pemberian ekstrak daun kaliandra merah (*Calliandra calothyrsus* Meissn.) dengan dosis dan interval waktu yang berbeda. *J Biol Udayana*. 2019;23(1):34–41.
  61. Syahputra G. Etika dalam penelitian biomedis dan uji klinis. *BioTrends*. 2018;9(1):7–15.
  62. Webster J. Animal welfare: Freedoms, dominions and “A life worth living”. *J Anim*. 2016;6(6):2–7.

